

실크 단백질 Sericin 및 Fibroin의 식이 공급이 아토피 피부염 동물 모델 NC/Nga Mice의 혈장과 표피의 유리 아미노산 함량에 미치는 영향*

김현애¹⁾ · 박경호¹⁾ · 여주홍²⁾ · 이광길²⁾ · 정도현³⁾ · 김성한³⁾ · 조윤희^{1)§}

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과,¹⁾ 농업진흥청 농업생물부,²⁾ (주)뉴트렉스³⁾

Dietary Effect of Silk Protein Sericin or Fibroin on Plasma and Epidermal Amino Acid Concentration of NC/Nga Mice*

Kim, Hyunae¹⁾ · Park, Kyung-Ho¹⁾ · Yeo, Joo-Hong²⁾ · Lee, Kwang-Gill²⁾
Jeong, Do-Hyeon³⁾ · Kim, Sung-Han³⁾ · Cho, Yunhi^{1)§}

Department of Medical Nutrition,¹⁾ Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea,

Department of Agricultural Biology,²⁾ National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-100, Korea
Nutrex Co.,³⁾ Ltd., Seoul, 137-919 Korea

ABSTRACT

Free amino acids in epidermis function as a major component of Natural Moisturizing Factor (NMF), which maintains the optimal level of water in skin even at the low humidity. In fact, the depletion of free amino acids is reported in the epidermis of atopic dermatitis, the skin condition involving dryness. As an effort searching the dietary source for improving the level of water and free amino acid in epidermis, the dietary effects of silk protein, sericin (S) and fibroin (F) on trans epidermal water loss (TEWL), and plasma and epidermal levels of free amino acids were compared in this study. Thirty of male NC/Nga mice, an animal model of atopic dermatitis, were divided into three groups: group CA as an atopic control with control diet, group S: 1% sericin diet and group F: 1% fibroin diet. Ten of male BALB/c mice were served as group C (control group) with control diet. All mice were fed on diet and water ad libitum for 10weeks. Dry skin condition was established in group CA as TEWL was increased (148.7% of group C). In parallel, epidermal level of glutamate, one of major amino acids functioning as NMF, was dramatically decreased and epidermal levels of methionine and alanine were inversely elevated. Dietary supplementation of sericin (group S) reduced TEWL at the similar level with group C and increased epidermal levels of glutamate as well as serine and glycine, the other major amino acids as NMF. Despite a marked decrease of methionine and alanine, the reduction of TEWL and epidermal levels of glutamate, serine and glycine of group F were less than of group S. Furthermore, in contrast to similar levels of other free amino acids in plasma and epidermis of group S and group C, plasma and epidermal levels of other free amino acids, specifically phenylalanine, isoleucine, cysteine and tyrosine in epidermis of group F, were significantly higher than of group C. Together, our data demonstrate that dietary supplementation of sericin is more effective at improving dry skin condition that paralleled with the normalization of free amino acids in plasma and epidermis of NC/Nga mice. (*Korean J Nutrition* 39(6): 520~528, 2006)

KEY WORDS : sericin, fibroin, amino acid, Natural Moisturizing Factor, NC/Nga mice.

서론

피부의 가장 외층인 표피는 외부 환경으로부터 인체를

접수일 : 2006년 7월 21일

채택일 : 2006년 9월 2일

*This work was supported by Nutrex Co., Ltd..

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : choyunhi@khu.ac.kr

보호할 뿐 아니라, 수분 증발 및 손실을 억제하여 피부의 건조화를 방지한다. 건강한 표피는 15~20%의 수분을 함유하고 있으며 수분이 10% 이하로 떨어지면 피부가 건조해지고, 거칠며, 윤기가 없어져 주름이 증가하게 된다.^{1,2)} 표피의 수분 함량은 피지막과 수용성 성분인 자연보습인자(Natural Moisturizing Factor, NMF)에 의해 유지되는데, 세라마이드, 콜레스테롤, 불포화 지방산의 지질 혼합체인 피지막이 층상 구조 (intercellular lamella sheets)를 이루

어 수분 손실을 억제하는 반면 극성 혼합체인 자연보습인자는 수분을 직접적으로 보유하거나 흡습하여 표피의 수분을 유지시킨다.³⁾

자연보습인자는 유리 아미노산과 유산 (lactic acid), 염을 비롯하여, 아미노산의 분해 과정에서 생성되는 pyrrolidone carboxylic acid (PCA)와 urocanic acid (UCA)를 포함하는 극성 혼합체인데 이중 유리 아미노산은 PCA의 다음가는 자연보습인자의 주요 구성 요소이다.³⁾ 표피의 아미노산 조성은 대부분의 아미노산이 일정한 범위에서 큰 변화 없이 유지되는 혈액의 아미노산 조성과는 상이한데,^{4,5)} 이는 serine과 glycine이 표피 전체 아미노산의 40% 이상을 차지하고 있는 반면 methionine, phenylalanine, threonine, valine, isoleucine, leucine이 표피에서 미량으로 존재하고 cysteine은 거의 존재하지 않는 것으로 설명된다.^{6,7)} 또한 표피의 serine과 glycine 함량은 피부의 건조화에 따라 민감하게 저하되는 것으로 보고되었는데,⁸⁾ 이는 표피에서 serine과 glycine이 주요 보습인자로서 표피의 수분 유지 기능을 함을 의미한다.

피부 건조화가 일어나는 대표적인 피부 질환으로 건선염과 아토피 피부염 질환이 알려져 있는데^{9,10)} 이중 특히 아토피 피부염은 전체 인구의 약 10~20%에게서 발병하고 있다. 아토피 피부염은 피부 건조화뿐 아니라 표피 과증식 (hyperkeratosis), 염증 등의 여러 증상을 같이 수반하는 피부 질병으로 이에 대한 현행 치료법은 부신피질 호르몬 제제나 자외선 요법을 통한 DNA 합성 억제, 세포 과증식 억제 및 염증억제에 중점을 두고 있으나 이와 같은 치료법들은 여러 부작용을 수반하고 근본적인 치유를 기대하기 어려운 실정이다.¹¹⁾ 최근 아토피 피부염 및 건선염 환자의 표피에서 자연보습인자의 수치 감소 보고와 더불어^{12,13)} 피부의 건조화 방지 및 촉촉한 느낌은 피부의 건강 차원에서 영양과 밀접한 관련이 있다는 일반인들의 인식 변화에 따라 특정 영양소 성분이나 이를 다량 함유한 식이 소재의 피부에 대한 효능연구가 국내외로 활발히 진행되고 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾

피부의 건조화 방지를 위한 기능성 소재로 실크단백질이 사용되고 있는데, 이는 실크 단백질의 아미노산 조성과 피부의 유리 아미노산 조성의 유사성에 기인한다. 누에고치에서 만들어지는 실크단백질은 성질이 전혀 다른 섬유상 단백질인 sericin과 fibroin이 각각 25%와 75%로 구성되어 있는데,¹⁸⁾ fibroin의 표면을 감싸고 있는 sericin은 serine, aspartate, threonine, glutamate의 극성 아미노산이 전체 구성 아미노산의 약 77%를 차지하여 분해되기 쉽고, 물에 녹기 쉬우며 특히, 그 자체로서 보습성을 가지는 serine이 약 30% 함유되어 있다.¹⁸⁾ 반면 fibroin은 glycine,

alanine, serine을 주요 구성아미노산으로 함유하고 있으나 serine의 함량은 12% 내외로 sericin에 비해 낮다. 이런 피부친화형 소재인 실크단백질을 이용하여 기능성 화장품, 미용 비누 등이 개발되어 있고, 피부 도포에 의한 보습성 증가,¹⁹⁾ 주름방지,²⁰⁾ tyrosinase 활성 억제 효과²¹⁾ 등이 보고되었다. 그러나 이들 실크 단백질의 피부에 대한 효능은 모두 도포에 의한 것으로, 실크 단백질 섭취에 의한 효과는 항산화 작용, 간 기능 개선 작용, 인슐린분비 촉진 작용, 혈중 콜레스테롤 상승억제 작용, 신경계 질환 예방 및 개선작용 등에서 한정적으로 보고되어 있을 뿐,¹⁸⁾ 실크 단백질의 섭취에 의한 피부에 대한 효능 보고는 전무한 실정이다. 따라서 실크단백질 sericin과 fibroin의 섭취 후 혈액에서의 영양 성분 및 피부에서의 기능성 성분에 대한 변화를 검토하는 것은 중요한 의미가 있는 것으로 여겨진다. 이에 본 연구에서는 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice에서^{11,22)} 실크 단백질 sericin 및 fibroin의 식이 공급에 따른 피부의 수분 함유량 및 혈액과 표피의 유리 아미노산 조성 변화를 비교·분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육

공기 청정 시설이 없는 일반 환경에서 자연적으로 아토피 피부염이 발병하는 5주령의 수컷 NC/Nga mice^{11,22)} 30마리와 5주령의 수컷 BALB/c mice 10마리를 중앙실험동물 사육장으로부터 공급받아 실험 식이로 사육하기 전 1주 동안 고형배합 사료로 적응시킨 후 난괴법으로 균을 나누어 각 식이와 물을 마음껏 섭취하도록 하였다. 면역 질환 연구에 사용되고 NC/Nga mice에 대한 정상대조군으로 자주 이용되는^{11,22)} BALB/c mice를 본 연구에서도 정상대조군으로 하였다. 사육실의 온도는 22 ± 1°C, 습도는 60 ± 5%를 유지하였고, 매일 광주기와 암주기가 12시간이 되도록 조절하였다. 체중 및 식이 섭취량은 1주일에 한 번씩 일정한 시각에 측정하였다.

2. 실크 단백질 시료 준비

실크단백질은 가잠 (*Bombyx mori*)을 상업으로 사육하여 얻은 누에고치를 정련하여 준비하였다. 실크단백질 sericin은 정련 과정에 의해 추출되었는데, 먼저 누에고치에 30배량의 물을 첨가하고 110°C에서 5시간 가열한 후 필터링 (Whatman No 2 paper)을 하여 잔유물을 제거하였다. 누에고치의 열수추출물에 실크 단백질 분해효소 (Novo, Denmark)의 불활성 처리를 한 후, 필터링 (0.45 μm, Sarto-

rims, Germany) 및 동결 건조의 과정을 거쳐 평균 분자량 (MW) 5,000내외의 실크단백질 세리신을 회수하였고 평균 분자량은 SDS-PAGE에 의해 확인하였다. 세리신 단백질이 제거된 생사에 50 배량의 5%의 마르셀 비누 및 3%의 Na_2CO_3 혼합 용액을 첨가하고 90°C에서 40분간 처리한 후, 증류수로 3번 정도 같은 작업을 반복하여 충분히 수세하였다. 이 과정 후 얻어진 silk 단백질 fibroin의 용해는 Madyarov 등²³⁾의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 효소 가수분해 용액을 Sephadex G-25 Gel Filtration Chromatography (Pharmacia, GradiFrac, UV-1 detection, Sweden) 장치를 이용하여 fibroin과 염을 완전히 분리하고 3%의 단백질 분해요소 (Nove, Denmark)를 첨가하여 질소가스 충전 조건 및 55°C에서 24시간 가수분해하였다. 이어서 100°C에서 5분간 효소의 불활성 처리를 한 후, 필터링 (0.45 μm , Sartorius, Germany)을 하여 잔유물을 제거하였다. 분리 정제된 sericin과 fibroin 시료를 -5°C 내외를 유지하는 감압 건조 장치 (삼원 냉열사, Model: Vacuum Freeze Dryer)를 이용하여 수용성 분말의 형태로 얻었다.²³⁾

3. 식이조성

각 실험군의 식이조성은 Table 1과 같으며 전체 식이무게 1% 수준의 sericin과 및 fibroin 건조 분말을 sericin군 (S군)과 fibroin군 (F군)의 각 식이에 혼합하여 10주

간 공급하였다. 실크단백질을 첨가하지 않은 정상식을 10주간 공급받은 NC/Nga mice (control A군: CA군) 및 BALB/c mice (control 군: C군)는 각각 아토피 피부염 대조군 및 정상대조군 이었다. C군과 CA군은 전체 식이무게 중 23%에 상응하는 단백질을 casein으로부터 공급받았다. 반면, S군과 F군은 22%의 단백질은 casein으로 나머지 1%는 실크단백질 sericin과 fibroin으로부터 각각 공급받았다. 각 실크 단백질의 아미노산 조성은 Table 2와 같으며, 전체 식이무게를 기준으로 하여 C/CA 식이에 의해 공급되는 serine은 11.27 g/kg 식이, glycine은 3.91 g/kg 식이 이었다. S식이에서 공급된 serine은 14.31 g/kg 식이, glycine은 5.13 g/kg 식이 이었고, F식이에 의해 공급된 serine은 12.48 g/kg 식이, glycine은 8.35 g/kg 식이 이었다.

4. 피부의 수분손실량 (Trans Epidermal Water Loss: TEWL) 측정

동물은 측정 3시간 전에 등 부위를 면도하고 제모제를 사용하여 잔여털을 제거한 후, 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$ 가 유지되는 사육실에 유지하였다. 피부의 수분 손실량 측정을 위해 Tewameter TM210[®] (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)의 탐침을 등 부위의 피부 표면에 밀착 접촉하여 가법계 눌러서 나타나는 수치를 기록하였다.

Table 1. Diet composition of experimental groups (g/kg)

Ingredients	Experimental groups ¹⁾			
	Control (C) (n = 10)	Control A (CA) (n = 10)	S (n = 10)	F (n = 10)
Cornstarch	372	372	372	372
Sucrose	200	200	200	200
Cellulose powder	50	50	50	50
Corn oil	100	100	100	100
Vitamin mixture ²⁾	10	10	10	10
Salt mixture ³⁾	35	35	35	35
L-cystine	3	3	3	3
Casein ⁴⁾	230	230	220	220
Sericin	0	0	10	0
Fibroin	0	0	0	10

1) Group C: BALB/c mice fed control diet, Group CA, S and F: NC/Nga mice fed control diet (group CA), S diet (group S) or F diet (group F)

2) Vitamin Mix Composition: AIN - 93 Vitamin Mix #310025 (Dyets Inc, Bethlehem, PA, USA): Niacin 3 g/kg, Calcium Pantothenate 1.6 g/kg, Pyridoxine HCl 0.06 g/kg, Thiamine HCl 0.6 g/kg, Riboflavin 0.6 g/kg, Folic Acid 0.2 g/kg, Biotin 0.2 g/kg, Vitamin E Acetate (500 IU/g) 15 g/kg, Vitamine B₁₂ (0.1%) 2.5 g/kg, Vitamine A Palmitate (500,000 IU/g) 0.8 g/kg, Vitamine D₃ (400,000 IU/g) 0.25 g/kg, Vitamine K₁/Dextrose Mix (10 mg/g) 7.5 g/kg, Sucrose 967.23 g/kg

3) Salt Mix Composition: AIN - 93 G salt mix #210025 (Dyets Inc, Bethlehem, PA, USA): Calcium Carbonate 357 g/kg, Potassium Phosphate (monobasic) 196 g/kg, Potassium Citrate H₂O 70.78 g/kg, Sodium Chloride 74 g/kg, Potassium Sulfate 46.6 g/kg, Magnesium Oxide 24 g/kg, Ferric Citrate U.S.P 6.06 g/kg, Zinc Carbonate 1.65 g/kg, Manganous Carbonate 0.63 g/kg, Cupric Carbonate 0.3 g/kg, Potassium Iodate 0.01 g/kg, Sodium Selenate 0.01025 g/kg, Ammonium Paramolybdate 4H₂O 0.00795 g/kg, Sodium Metasilicate 9H₂O 1.45 g/kg, Chromium Potassium Sulfate 12H₂O 0.275 g/kg, Lithium Chloride 0.0714 g/kg, Boric Acid 0.0815 g/kg, Sodium Fluoride 0.0635 g/kg, Nickel Carbonate 0.0318 g/kg, Ammonium Vanadate 0.066 g/kg, Sucrose finely powdered 221.026 g/kg

4) Casein (nitrogen \times 6.25), 870 g/kg

5. 혈장 및 표피의 유리 아미노산 함량 측정

Heparin이 함유된 주사기를 이용하여 채취한 혈액을 3,000 × g에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리하고 아미노산 분석 전까지 -70℃에서 냉동 보관하였다. 피부에 1 : 1 비율의 Hank 용액 (Hank's Balanced Salt Solution: Gibco BRL)과 Dispase (Roche, Germany) 혼합 용액을 첨가하고 4℃에서 16시간 동안 처리하여 표피를 분리하였다. 표피 조직에 0.05M potassium phosphate buffer (pH 6.8)를 첨가한 후 polytron을 이용하여 분쇄하고 3,000 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 혈청과 표피 상층액 (시료 100 μl)에 50% Trichloroacetic acid (TCA)를 최종 농도가 15% 되도록 가하여 혼합한 후 4℃에서 16시간 동안 방치하였다.²⁴⁾ 12,000 × g에서 10분간

원심 분리하여 단백질을 제거한 후 상층액을 아미노산 분석 전에 0.2 μm filter (Sartorius, Germany)로 여과하였다. 아미노산 농도 분석은 아미노산 전용 분석기 (ion exchange chromatography: SHIMAZU Model LC-5A)를 사용하였으며, lithium high performance column에서 0.20 M lithium citrate buffer pH 2.80, 0.30 M lithium citrate buffer pH 3.00, 0.50M lithium citrate buffer pH 3.15, 0.90M lithium citrate buffer pH 3.50과 1.65M lithium citrate buffer pH 3.55를 mobile phase로 단계적으로 사용하여 각 유리 아미노산을 분리하였다.²⁵⁾

6. 통계분석

실험 결과의 자료는 SPSS, Ver 12.0 program (Statistical package for social science)을 이용하여 통계 처리하였다. 결과는 각 군별 평균과 표준오차로 나타내었고 각 실험군 간의 비교는 one way ANOVA로 분석한 후 General linear model (GLM) test로 p < 0.05 수준에서 검증하였다.

Table 2. Amino acid composition of casein and silk protein

Amino acid	Casein	Silk protein	
		Sericin	Fibroin
EAA¹⁾			
Arginine	3.5	2.8	0.5
Histidine	2.9	0.9	0.2
Isoleucine	5.2	1.4	0.7
Leucine	8.9	0.6	0.5
Lysine	7.6	10.2	0.3
Methionine	2.8	<0.05	0.1
Phenylalanine	4.8	0.4	0.6
Threonine	3.9	6.0	0.9
Tryptophan	1.2	0.0	0.2
Valine	6.4	2.6	2.2
NEAA¹⁾			
Alanine	2.8	4.6	29.3
Aspartate	6.7	19.1	1.3
Cysteine	0.5	<0.05	0.2
Glutamate	20.2	4.1	1.0
Glycine	1.7	12.2	44.4
Proline	10.7	0.8	0.3
Serine	4.9	30.4	12.1
Tyrosine	5.3	3.8	5.2
Total (%)	100.0	100.0	100.0

1) EAA: Essential Amino Acid, NEAA: Non Essential Amino Acid

결과 및 고찰

1. 체중 및 식이 섭취량

실험동물의 평균 체중 증가량 및 식이 섭취량은 Table 3에 제시하였다. C군과 CA군 모두 정상식이를 10주간 공급하였음에도 불구하고 BALB/c로 구성된 C군의 평균 체중 증가량 및 식이 섭취량이 NC/Nga mice로 구성된 CA군에 비해 낮았는데, 정상식이를 공급한 BALB/c의 주령 별 체중 증가가 NC/Nga mice보다 낮은 것이 보고되어 있어^{26,27)} 이는 종간의 상이성에 의해 기인한 것으로 여겨진다. NC/Nga mice로 구성된 S군 및 F군의 체중 증가량과 식이 섭취량은 CA군과 유의적 차이가 없었다. C군을 포함한 모든 실험군의 식이 효율 (체중증가량 (g)/식이섭취량 (g))은 유의적 차이가 없었다 (p < 0.05).

2. 실크 단백질 Sericin과 fibroin의 식이 공급이 표피의 수분 손실량에 미치는 효과

10주간의 각 식이 공급 후 Tewameter를 이용하여 측정

Table 3. Weight gain, daily food intake and food efficiency ratio (FER) of BALB/c mice (C) and NC/Nga mice (CA) fed the control diet, sericin supplemented (S) or fibroin supplemented diet (F) for 10 weeks¹⁾

Groups ²⁾	C	CA	S	F
Weight gain (g/week)	3.3 ± 0.43 ^b	4.3 ± 0.49 ^a	4.5 ± 0.71 ^a	4.6 ± 0.73 ^a
Food intake (g/week)	6.6 ± 0.49 ^b	8.7 ± 0.48 ^a	11.3 ± 0.72 ^a	9.2 ± 0.50 ^a
FER ³⁾	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.5 ± 0.41

1) Values are mean ± standard error (n = 10). Different superscripts in the same row indicate significant differences (p < 0.05).

2) Group C: BALB/c mice fed control diet, Group CA, S and F: NC/Nga mice fed control diet (group CA), S diet (group S) or F diet (group F)

3) Food Efficiency Ratio (FER) = The gain of body weight (g) / The amounts of food intake (g)

된 CA군 표피에서의 수분손실량 (Trans Epidermal Water Loss: TEWL) ($8.24 \pm 0.78 \text{ g/m}^2/\text{hr}$)은 정상대조군인 C군에 ($5.54 \pm 0.69 \text{ g/m}^2/\text{hr}$) 비해 유의적으로 높았는데 (Fig. 1) ($p < 0.05$), 이는 아토피 피부염 발병 후 NC/Nga mice의 표피 수분손실량이 BALB/c mice에 비해 현저히 증가함을 보고한 사전 연구 보고와^{11,22)} 일치하는 결과로 NC/Nga mice가 아토피 피부염의 주요 증상인 피부 건조화를 수반하는 적절한 아토피 피부염 동물 모델임을 재확인하였다. S군과 ($5.78 \pm 0.83 \text{ g/m}^2/\text{hr}$) F군의 ($6.92 \pm 0.43 \text{ g/m}^2/\text{hr}$) 표피 수분손실량은 두 군 모두 CA군보다 낮았으나, F군의 수분 손실량이 C군에 비해서는 다소 높은

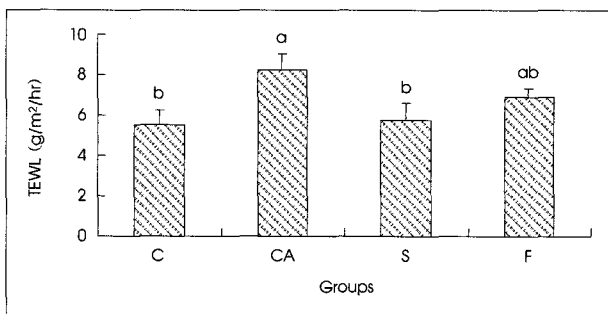


Fig. 1. Trans epidermal water loss (TEWL) in BALB/c mice (C) and NC/Nga mice fed the control diet (CA), sericin supplemented (S) or fibroin supplemented diet (F). Values are mean \pm standard error (n = 10). Mean with different letters differ $p < 0.05$.

반면, S군은 C군과 유사하였다. 이는 실크 단백질 sericin의 식이 보충에 의한 표피 수분 손실량 감소 효과가 fibroin에 비해 유의적으로 나타났다 ($p < 0.05$).

3. 실크 단백질 Sericin과 fibroin의 식이 공급이 혈장 내 유리 아미노산 함량에 미치는 효과

혈장에서의 유리 아미노산 분석 결과는 정상대조군인 C군을 기준으로 농도가 높은 아미노산부터 배열 정리하여 Table 4에 나타내었다. BALB/c mice로 구성된 C군의 경우 Proline이 가장 높았고, 그 다음이 alanine, glutamate, glycine의 순으로 $200 \mu\text{mol}/100 \text{ ml}$ 이상의 농도를 나타내었다. Leucine을 제외한 그 이외의 아미노산은 모두 $71.8 \sim 183.2 \mu\text{mol}/100 \text{ ml}$ 농도 범위에서 머물렀으며, leucine의 농도는 $12.3 \pm 0.98 \mu\text{mol}/100 \text{ ml}$ 로 혈장내의 농도가 가장 낮았다. 이 결과를 C57 BL/6나 Webster Swiss albino 등의 mice를 대상으로 혈장의 유리 아미노산 농도를 관찰한 Rivera²⁸⁾와 Stegnik²⁹⁾의 연구 결과와 비교하면 혈장 내 각 아미노산의 농도가 높은 순서는 다소 다른 점이 있으나 모든 아미노산의 농도가 $10 \sim 500 \mu\text{mol}/100 \text{ ml}$ 범위이고 대부분은 $50 \sim 200 \mu\text{mol}/100 \text{ ml}$ 농도 범위에서 머무른 점이 일치하였다. NC/Nga mice로 구성된 CA군의 혈장 내 proline, glutamate, glycine, serine, lysine, threonine, arginine, histidine, valine의 농도는 C군에 비

Table 4. Free amino acid concentration in plasma of BALB/c mice (C) and NC/Nga mice (CA) fed the control diet, sericin supplemented (S) or fibroin supplemented diet (F)¹⁾

AA	Groups			
	C	CA	S	F
	$\mu\text{mol}/100 \text{ ml}$			
Proline	369.1 ± 58.11^b	129.5 ± 25.45^c	311.6 ± 81.00^{bc}	580.9 ± 129.01^a
Alanine	355.5 ± 21.09^{ab}	352.3 ± 23.76^{ab}	298.1 ± 30.54^b	403.6 ± 27.67^a
Glutamate	293.5 ± 11.78^{ab}	154.0 ± 21.29^c	257.7 ± 28.99^b	341.9 ± 20.71^a
Glycine	217.1 ± 7.23^{bc}	179.7 ± 10.65^c	226.0 ± 16.87^b	275.9 ± 7.08^a
Serine	183.2 ± 7.35^{ab}	110.8 ± 7.28^c	177.8 ± 18.90^b	221.7 ± 12.12^a
Phenylalanine	181.8 ± 6.28^b	158.5 ± 12.15^b	164.3 ± 17.13^b	230.0 ± 7.01^a
Isoleucine	175.6 ± 4.19^a	151.4 ± 9.45^a	63.1 ± 34.70^b	101.6 ± 38.93^{ab}
Lysine	174.7 ± 5.15^a	78.6 ± 23.40^b	166.2 ± 11.78^a	200.9 ± 5.39^a
Threonine	162.1 ± 14.15^{ab}	110.9 ± 10.72^c	134.3 ± 18.40^{bc}	182.6 ± 15.32^a
Cysteine	150.5 ± 74.14^a	182.3 ± 8.44^a	nd ²⁾	nd ²⁾
Tyrosine	125.5 ± 5.19^b	114.3 ± 10.78^b	109.8 ± 13.53^b	166.4 ± 8.09^a
Arginine	114.1 ± 5.64^b	59.9 ± 14.52^c	102.1 ± 13.68^b	152.5 ± 11.15^a
Aspartate	109.7 ± 51.76^c	190.9 ± 15.2^{bc}	249.3 ± 26.13^{ab}	298.0 ± 15.02^a
Histidine	90.1 ± 20.47^c	27.9 ± 2.65^d	128.0 ± 10.96^b	175.0 ± 4.80^a
Methionine	88.5 ± 3.06^b	63.2 ± 9.26^b	79.6 ± 10.50^b	128.9 ± 4.52^a
Valine	71.8 ± 0.90^b	nd ²⁾	75.8 ± 5.80^b	94.6 ± 4.89^a
Leucine	12.3 ± 0.98^b	10.7 ± 1.01^b	162.9 ± 27.98^a	152.8 ± 50.20^a
Tryptophan	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾

1) Values are mean \pm standard error (n = 10). Different superscripts in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

2) nd, Not detected

해 낮았는데 NC/Nga mice의 혈장 내 유리 아미노산 농도가 아직까지 문헌에 보고된 바가 없어 이와 같은 결과가 아토피 피부염 발병에 따른 변화인지 또는 NC/Nga mice와 BALB/c mice의 종간의 차이에 의한 것인지 현재로는 판단할 수 없다. 그러나 NC/Nga mice에 실크 단백질 sericin을 식이 공급한 S군의 혈장 내 유리 아미노산 농도 분석 결과 proline, glutamate, glycine, serine, lysine, threonine, arginine, histidine, valine, leucine의 농도가 CA군에 비해 높았으며, histidine과 leucine을 제외하고는 이들 아미노산 농도가 C군과 유사하여 이 결과는 CA군 혈장에서 이들 아미노산의 농도가 낮게 측정된 유형은 NC/Nga mice와 BALB/c mice의 종간의 차이보다는 아토피 피부염 발병에 따른 변화인 것으로 여겨진다. 실크단백질 fibroin을 식이 공급한 F군에서는 proline, glutamate, glycine, serine, lysine, threonine, arginine, histidine, valine, leucine뿐 아니라 methionine, phenylalanine, aspartate의 농도가 CA군에 비해 높았는데 대부분의 유리 아미노산의 증가 정도는 S군에 비해 더욱 높았으며 C군에 비해서도 유의적으로 높아, 이 결과는 fibroin보다는 sericin 섭취 후 혈장 유리 아미노산의 유형이 C군과 유사하게 변화되었음을 의미한다. 특이하게도 S군과 F군에서 모두 histidine과 leucine의 농도가 C군 및 CA군에 비해 현저히 높았으며 cysteine

은 나타나지 않았다. 최근에 필수 아미노산중 가장 미량으로 존재하는 tryptophan 및 indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase (IDO)에 의한 tryptophan의 분해 대사산물인 kynurenine이 Th2면역 세포의 활성 조절을 통하여 아토피 피부염의 원인으로 제시되고 있으며,^{30,31)} 아토피 피부염 환자의 tryptophan와 kynurenine 혈장 농도 및 IDO 활성이 정상인에 비해서 낮은 것으로 보고되고 있으나³⁰⁾ C군을 비롯하여 NC/Nga mice로 구성된 CA, S, 및 F군의 모든 실험군의 혈장에서 tryptophan이 나타나지 않았다.

4. 실크 단백질 Sericin과 fibroin의 식이 공급이 표피의 유리 아미노산 함량에 미치는 효과

C군을 기준으로 농도가 높은 순으로 배열 정리한 표피에서의 유리 아미노산 농도는 (Table 5) 각 유리 아미노산의 농도가 0.0~600.0 μmol/100 ml 범위에서 어느 정도 고르게 측정된 혈장과 (Table 4) 달리 종류에 따라 0.0~9726.6 μmol/100 ml의 넓은 범위에서 측정되었다. 정상 대조군 C군의 표피에서는 glutamate와 (9222.4 μmol/100 ml) serine의 (4285.4 μmol/100 ml) 농도가 절대적으로 높았는데, 이는 측정된 혈액 내의 glutamate와 serine의 농도의 20~30배 이상이었다. 그 다음으로 lysine, glycine, histidine, aspartate, alanine의 순으로 100 μmol/100 ml 이상의 농도를 나타내었고 threonine, arginine, tyrosine,

Table 5. Free amino acid concentration in epidermis of BALB/c mice (C) and NC/Nga mice (CA) fed the control diet, sericin supplemented (S) or fibroin supplemented diet (F)¹⁾

AA	Groups			
	C	CA	S	F
	μmol/ 100 ml			
Glutamate	9222.4 ± 2338.60 ^o	nd ²⁾	2439.7 ± 97.6 ^o	148.0 ± 55.94 ^c
Serine	4285.4 ± 1353.42 ^b	5105.0 ± 56.75 ^b	9726.6 ± 1982.84 ^o	260.9 ± 41.87 ^c
Lysine	519.1 ± 143.41 ^o	341.5 ± 139.36 ^a	390.1 ± 86.23 ^o	305.2 ± 38.21 ^o
Glycine	245.2 ± 82.09 ^o	278.1 ± 42.40 ^b	762.7 ± 264.12 ^o	nd ²⁾
Histidine	202.8 ± 58.72 ^o	299.2 ± 39.72 ^a	444.2 ± 157.37 ^o	185.6 ± 45.27 ^o
Aspartate	181.3 ± 36.59 ^o	231.8 ± 60.08 ^a	219.0 ± 34.12 ^o	nd ²⁾
Alanine	107.5 ± 29.45 ^o	288.5 ± 53.13 ^a	nd ²⁾	nd ²⁾
Threonine	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾
Arginine	50.3 ± 12.46 ^o	61.1 ± 26.11 ^b	822.3 ± 178.72 ^o	109.2 ± 53.91 ^b
Tyrosine	29.6 ± 9.08 ^o	42.6 ± 5.06 ^o	58.9 ± 12.38 ^o	6541.2 ± 803.55 ^o
Valine	10.1 ± 8.45 ^o	20.9 ± 5.27 ^b	169.9 ± 55.53 ^a	nd ²⁾
Phenylalanine	5.0 ± 1.99 ^o	5.4 ± 1.23 ^b	10.9 ± 3.11 ^b	322.4 ± 40.36 ^a
Cysteine	2.2 ± 1.05 ^o	nd ²⁾	3.1 ± 2.10 ^b	620.9 ± 94.30 ^a
Proline	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾
Methionine	nd ²⁾	2069.8 ± 274.42 ^o	793.0 ± 361.63 ^b	nd ²⁾
Isoleucine	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾	292.9 ± 62.34
Leucine	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾
Tryptophan	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾	nd ²⁾

1) Values are mean ± standard error (n = 10). Different superscripts in the same row indicate significant differences (p < 0.05).
 2) nd, Not detected

valine, phenylalanine, cysteine은 100 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ 미만의 농도로 측정되었는데 표피에서의 tyrosine, valine, phenylalanine, cysteine 농도는 혈액 농도의 1/4~1/68 수준이었다. Proline, methionine, isoleucine, leucine, tryptophan은 전혀 측정되지 않았는데 이 결과는 serine과 glycine이 표피 전체 유리 아미노산의 40% 이상을 차지하고 있는 반면 methionine, phenylalanine, threonine, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, cysteine 및 tryptophan이 미량 아미노산으로 표피에서는 소량 존재함을 보고한 여러 사전 연구 보고들과 일치하였다.^{6,7,32)} 혈액에서의 유리 아미노산은 에너지원의 역할을 위해 서로 유기적인 관계를 유지하고 있는 반면 표피에서의 유리 아미노산은 에너지원의 역할보다는 수분유지를 위한 자연보습인자로서의 개별적인 독특한 기능을 우선적으로 수행하는 것으로 알려져 있다.^{6-8,32)} C군의 표피에서 가장 높은 농도로 측정된 glutamate는 아미노산 자체로서 직접적인 자연 보습인자의 역할을 하기도 하나 그 보다는 γ -glutamyl cyclotransferase에 의해 자연보습인자의 주요 구성 인자인 pyrrolidone carboxylic acid (PCA)로 대사되어 표피의 수분유지 기능을 한다.^{8,32)} 불필수 아미노산인 serine은 에너지 대사와 관련 하여서는 glycine으로 전환되므로³²⁾ 혈액에서 측정된 serine과 glycine의 농도는 거의 1:1 비율이었으나 (Table 4), 표피에서 측정된 serine의 농도는 glycine에 비해 17배 이상 높았는데 이는 기니피그 피부와 인간 피부에서 현저히 높은 serine의 함량을 보고한 Tabachnick 등⁶⁾의 보고와 일치하는 결과로, serine은 피부에서 에너지원의 역할보다는 수분 유지를 위한 자연보습인자로서의 독특한 기능을 우선적으로 수행함을 의미한다.

CA군의 표피에서는 glutamate가 전혀 측정되지 않은 반면 methionine과 alanine은 C군에 비해 유의적으로 증가하였고 serine을 비롯한 그 이외의 아미노산의 농도는 C군과 유사하였다 (Table 5). C군의 표피에서 100 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ 미만의 농도로 측정되었던 threonine과 cysteine은 CA군의 표피에서는 측정되지 않았다. 이 결과는 Fig. 1의 결과와 함께 CA군 표피의 유의적으로 높은 수분 손실량은 (threonine과 cysteine의 감소도 어느 정도는 원인 일 수 있으나) glutamate 농도의 현저한 감소 및 methionine과 alanine의 농도 증가에 주로 기인하였음을 제안한다. Sodium lauryl sulfate (LAS)의 도포에 의해 표피 과증식 (Hyperkeratosis)이 유도된 표피에서는 serine, glycine, alanine의 농도가 급격히 감소하는 것으로 보고되어 있으나,⁸⁾ 아토피 피부염 동물 모델인 CA군에서는 alanine의

농도가 유의적으로 증가한 반면 serine과 glycine 농도는 C군과 유사하여 표피의 과증식과 더불어 건조화 및 염증 등의 여러 증상을 수반한 아토피 피부염의 표피에서는 단순한 표피 과증식의 경우와는 구분되는 유리 아미노산의 변화가 있는 것으로 여겨진다.

실크단백질 sericin을 식이 공급한 S군의 표피에서는 CA군에서 측정되지 않았던 glutamate를 비롯하여 표피의 주요 유리 아미노산인 serine과 glycine의^{6,7,32)} 농도가 유의적으로 증가하였으며 CA군에서 높게 측정된 methionine 및 alanine이 유의적으로 감소하거나 나타나지 않았다. Arginine 및 valine 농도의 증가를 제외하고 그 외의 아미노산 (histidine, isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, threonine, aspartate, cysteine, proline, tyrosine)의 표피 내 농도는 C군 및 CA군과 유사하였다. 반면 실크단백질 fibroin을 식이 공급한 F군에서는 glutamate의 증가 정도가 미미한 수준이었으며 serine이 C군보다 현저히 낮은 수준으로 감소하였으며 glycine은 측정되지 않았다. F군에서는 CA군에서 높게 측정된 methionine 및 alanine이 나타나지 않았으나, 표피에서 미량으로 존재하는 것으로 알려진 phenylalanine, isoleucine, cysteine, tyrosine의 농도가 C군에 비해 60~280배 이상 현저히 증가하였다. 반면 F군의 표피에서는 다른군들과 달리 aspartate가 나타나지 않았다. 이 결과는 fibroin 섭취가 아토피 피부염 동물 모델 NC/Nga mice의 표피에서 높게 측정된 methionine 및 alanine을 현저히 감소시켰음에도 불구하고, 표피의 주요 유리 아미노산 (glutamate, serine, glycine)의 감소 및 tyrosine을 비롯한 표피의 미량 유리 아미노산의 함량을 절대적으로 증가시켰음을 제시한다. 반면 실크단백질 sericin의 섭취는 NC/Nga mice의 표피에서 glutamate를 어느 정도 증가시켰으며 serine과 glycine 농도의 현저한 증가와 더불어 methionine과 alanine의 유의적인 감소를 초래하여 궁극적으로 표피의 수분 손실량을 정상대조군 C군과 유사한 수준으로 감소시켰다. 이와 같은 sericin섭취에 의한 표피 아미노산의 긍정적인 변화가 sericin의 아미노산 배열 순서, sericin 단백질의 소화 및 대사 과정 등의 복합적 요인에도 불구하고^{33,34)} 어느 정도는 sericin의 serine 아미노산의 높은 함량에 의해 야기된 것인지는 추후의 심도 깊은 연구에 의해 파악되어야 하나 본 연구에서 제시된 sericin의 식이 섭취 후 fibroin을 증가하는 표피 수분손실량 억제 및 자연 보습인자의 기능을 하는 표피 내 아미노산의 긍정적인 변화는 sericin의 피부 보습 증진을 위한 건강 기능식품 소재로의 개발 가능성을 제안한다.

요약 및 결론

본 연구에서는 아토피 피부염 동물 모델인 NC/Nga mice에 실크 단백질 sericin과 fibroin을 식이 공급 후 피부의 수분 함유량 및 혈액과 표피의 유리 아미노산 조성 변화를 정상대조군인 BALB/c mice 및 아토피 피부염 대조군과 비교·분석하였으며 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 10주간의 실험 기간 동안 NC/Nga mice에 실크 단백질 sericin과 fibroin을 식이 공급한 S군 및 F군의 평균 체중 증가량 및 식이섭취량은 아토피 피부염 대조군 (CA군)과 유의적 차이가 없었다.

2) CA군의 표피 수분 손실량은 정상대조군인 C군에 비해 유의적으로 높았다. S군과 F군의 표피 수분 손실량은 두군 모두 CA군에 비해서는 낮았으나, F군의 수분 손실량이 C군에 비해서 다소 높은 반면, S군은 C군과 유사하여 S군의 수분 손실량 억제 효과가 F군에 비해 더욱 우수하였다.

3) CA군의 혈장 내 proline, glutamate, glycine, serine, lysine, threonine, arginine, histidine, valine의 농도는 C군에 비해 낮았다. S군과 F군의 혈장내 proline, glutamate, glycine, serine, lysine, threonine, arginine, histidine, valine, leucine의 농도가 두군 모두 CA군에 비해 높았는데, S군에서는 histidine과 leucine을 제외한 이들 유리 아미노산의 농도가 C군과 유사한 반면 F군에서는 대부분의 이들 유리아미노산의 농도가 모두 C군에 비해 현저히 높았다. 또한 F군에서는 혈장 내 methionine, phenylalanine, aspartate의 농도도 C군보다 높았다. 즉 F군보다는 S군의 혈장 내 유리 아미노산 유형이 C군과 유사하게 변화되었다.

4) 모든 실험군 표피에서의 유리 아미노산 농도는 각 유리 아미노산의 농도가 일정 범위에서 고르게 측정된 혈장과 달리 종류에 따라 넓은 범위에서 다양하게 측정되었다. 즉 C군 표피의 glutamate와 serine 농도는 혈액 농도의 20~30배 이상인 반면 표피의 tyrosine, valine, cysteine, phenylalanine 농도는 혈액 농도의 1/4~1/68 수준이었는데 이는 표피에서의 유리 아미노산은 에너지원의 역할보다는 수분유지를 위한 자연보습인자로서의 개별적인 독특한 기능을 우선적으로 수행하는 것을 의미한다.

5) CA군의 표피에서는 glutamate가 전혀 측정되지 않은 반면 methionine과 alanine은 C군에 비해 유의적으로 증가하였고 serine을 비롯한 그 이외의 아미노산의 농도는 C군과 유사하였다. S군에서는 CA군에서 측정되지 않았던 glutamate를 비롯하여 serine과 glycine의 농도가 유

의적으로 증가하였으며 CA군에서 높게 측정된 methionine 및 alanine이 유의적으로 감소하였다. F군에서는 methionine 및 alanine이 나타나지 않았으나, 표피에서 미량으로 존재하는 것으로 알려진 phenylalanine, isoleucine, cysteine, tyrosine의 농도가 C군에 비해 60~280배 이상 현저히 증가하였다.

결론적으로 실크단백질 sericin의 10주간 식이 섭취는 혈장 및 표피의 유리 아미노산의 유형을 fibroin보다 더욱 정상대조군과 유사하게 변화시켰고, 궁극적으로 표피의 수분 손실량을 정상대조군과 유사한 수준으로 감소시켰다.

Literature cited

- 1) Loden M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorder. *Am J Clin Dermatol* 4: 771-88, 2003
- 2) Sator PG, Schmidt JB, Honigsmann H. Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 48: 352-358, 2003
- 3) Rawlings AV, Harding CR. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17: 43-48, 2004
- 4) Potter EL, Purser DB, Cline JH. Effect of various energy sources upon plasma free amino acids in sheep. *J Nutr* 95: 655-663, 1968
- 5) Boomgaardt I, McDonald BE. Comparison of fasting plasma amino acid patterns in the pig, rat and chicken. *Can J Physiol Pharmacol* 47: 392-395, 1969
- 6) Tabachnick J, Labadie JH. Studies on the biochemistry of epidermis. *J Invest Dermatol* 54(1): 24-31, 1970
- 7) Steven AC, Steinert PM. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 107: 693-700, 1994
- 8) Koyame J, Horii I, Kawasaki K, Nakayama Y, Morikawa M, Mitsui T. Free amino acids of stratum corneum as a biochemical marker to evaluate dry skin. *J Soc Cosmet Chem* 35: 183-195, 1984
- 9) Yamamura T, Tezuka T. The water-holding capacity of the stratum corneum measured by ¹H-NMR. *J Invest Dermatol* 93: 160-164, 1989
- 10) Bikowski J. The use of therapeutic moisturizers in various dermatologic disorders. *Cutis* 68: 3-11, 2001
- 11) Aioi A, Tonogaito H, Hamada H, Ra C, Ogawa H, Maibach H, Matsuda H. Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 144: 12-18, 2000
- 12) Lee YW, Lee KG, Yeo JH. Health method with silk. Joongang publishing Co., 2003
- 13) Marstein S, Jellum E, Eldjarn L. The concentration of pyroglutamic acid (2-pyrrolidone-5-carboxylic acid) in normal and psoriatic epidermis, determined on a microgram scale by gas chromatography. *Clin Chim Acta* 49: 389-395, 1973

- 14) Seong K, Kim JY, Lee JH, Park SK, Cho Y. Arctii Fructus is a prominent dietary source of linoleic acid for reversing epidermal hyperproliferation of guinea pigs. *Korean J Nutrition* 36: 819-827, 2003
- 15) Chung S, Kong S, Seong K, Cho Y. γ -Linoleic acid in borage oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs. *J Nutr* 132: 3090-3097, 2002
- 16) Taniguchi Y, Kohno K, Inoue SI, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol* pp.313-324, 2003
- 17) Masumoto M, Kotani M, Fujita A, Higa S, Kishimoto T, Suemura M, Tanaka T. Oral administration of persimmon leaf extract ameliorates skin symptoms and transepidermal water loss in atopic dermatitis model, NC/Nga. *Br J Dermatol* 146: 221-227, 2002
- 18) Lee KG, Yeo JH, Lee YW, Kweon HY, Woo SO, Han SM, Kim JH. Studies on industrial utilization of silk protein. *Food Science and Industry* 36: 25-37, 2003
- 19) Lee KG, Yeo JH, Lee YW, Kweon HY, Kim JH. Bioactive and skin-compatible properties of silk sericin. *Korean J Seric Sci* 43(2): 109-115, 2001
- 20) Engel W. The effect of sericin shampoos. *Arztl Kosmetol* 17: 91-110, 1987
- 21) Kato, N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci Biotech Biochem* 62: 145-147, 1998
- 22) Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K. NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 120: 70-75, 1999
- 23) Madyarov S, Lee KG, Yeo JH, Nam J, Lee YW. Improved method for the preparation of silk fibroin hydrolysates. *Korean J Seric Sci* 41(2): 102-110, 2000
- 24) The Korean society of food science and nutrition. Amino acid and protein. In: Handbook of Experiments in Food Science and Nutrition, Part of Nutrition, pp.181-189, Hyoil publishing Co, Seoul, 2000
- 25) Moore S, Stein WH. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In: Colowick Sp, Kaplan No, eds. Methods in Enzymology, Vol 6, pp.819-831, Academic Press, New York, 1963
- 26) NC/Nga mice In: 2003 Data of laboratory animals, pp.89-91, Japan SLC, Inc, Kwandong, 2003
- 27) BALB/c mice In: 1998 Data of laboratory animals, pp.29-30, Japan SLC, Inc, Kwandong, 1998
- 28) Rivera S, Lopez-Soriano J, Azcon-Bieto J, Argile JM. Blood amino acid compartmentation in mice bearing lewis lung carcinoma. *Cancer Res* 47: 5644-5646, 1987
- 29) Stegink LD, Shepherd JA, Brummel MC, Murray LM. Toxicity of protein hydrolysate solutions: correlation of glutamate dose and neuronal necrosis to plasma amino acid levels in young mice. *Toxicology* 2: 285-299, 1974
- 30) Raitala A, Karjalainen J, Oja SS, Kosunen TU, Hurme M. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity is lower in atopic than in non-atopic individuals and is enhanced by environmental factors protecting from atopy. *Mol Immunol* 43: 1054-1056, 2006
- 31) von Bubnoff D, Fimmers R, Bogdanow M, Matz H, Koch S, Bieber T. Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure. *Clin Exp Allergy* 34: 1056-1063, 2004
- 32) Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 103(5): 731-741, 1994
- 33) Groff JL, Gropper SS. Protein. In: Advanced Nutrition and Human Metabolism 3rd ed. pp.178-204, Wadsworth/Thomson learning, Connecticut, 1999
- 34) Zhaorigetu S, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(10): 2181-2186, 2001